

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-056684

(43)Date of publication of application : 05.03.1996

(51)Int.Cl.

C12P 13/02
// (C12P 13/02
C12R 1:01)

(21)Application number : 06-192572

(71)Applicant : MITSUI TOATSU CHEM INC

(22)Date of filing : 16.08.1994

(72)Inventor : OIKAWA TOSHIHIRO
YAMAKI TOSHIBUMI
ARII TERUO
TSURUOKA MIYUKI

(54) PRODUCTION OF AMIDE COMPOUND WITH MICROORGANISM

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a high-purity amide compound at a high concentration by reacting a nitrile compound with a microbial cell (a treated substance), etc., of a specific thermophilic microorganism capable of hydrating the nitrile compound and converting the nitrile compound into the corresponding amide compound.

CONSTITUTION: This method for producing an amide compound with a microorganism is to react a nitrile compound with a thermophilic microorganism having $\geq 55^{\circ}\text{C}$ growth upper limit temperature and the ability to hydrate the nitrile compound and convert the nitrile compound into the corresponding amide compound, e.g. *Pseudonocardia thermophila* ATCC19285 in an aqueous medium. Besides, the microbial cell or a treated substance thereof, the microorganism may be a culture solution thereof and the reaction can stably be carried out within a wide pH range and temperature range (especially $\geq 40^{\circ}\text{C}$).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The manufacturing method of the amide compound by the microorganism characterized by for growth upper limit temperature being the thermophilic bacterium which is 55 degrees C or more, and making the culture medium, fungus body, or fungus body processing object of the microorganism which has the capacity to change a nitril compound into the amide compound which hydrates and corresponds act on this nitril compound in an aqueosity medium.

[Claim 2] The manufacturing method of the amide compound by the microorganism characterized by making the culture medium, fungus body, or fungus body processing object of the microorganism which has the capacity to be the thermophilic bacterium whose growth upper limit temperature is 55 degrees C or more, to belong to the Pseudonocardia (Psuedonocardia) group, and to change a nitril compound into the amide compound which hydrates and corresponds act on this nitril compound in an aqueosity medium.

[Claim 3] The manufacturing method of the amide compound according to claim 2 characterized by the microorganism belonging to the Pseudonocardia (Psuedonocardia) group being the Pseudonocardia thermostat filler (Psuedonocardia thermophila) ATCC19285.

[Claim 4] The manufacturing method of the amide compound according to claim 2 or 3 with which a nitril compound is characterized by being acrylic nitril and meta-acrylonitrile.

[Claim 5] The manufacturing method of the amide compound according to claim 1 to 4 characterized by reaction temperature being 0-80 degrees C.

[Claim 6] The manufacturing method of the amide compound according to claim 1 to 5 characterized by pH of a reaction being 3-10.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. *** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the approach of manufacturing the amide compound which hydrates a nitril compound according to an operation of a microorganism, and corresponds.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, some methods of producing an amide compound from a nitril compound are proposed using the microorganism. For example, a bacillus (Bacillus) group, a BAKUTE resume (Bacteridium) group, The approach using a micrococcus (Micrococcus) group and a BUREBI bacterium (Brevibacterium) group (JP,62-21519,B), The approach using the Corynebacterium (Corynebacterium) group and the Nocardia (Nocardia) group (JP,56-17918,B), The approach using the Pseudomonas (Pseudomonas) group (JP,59-37951,B), A Rhodococcus (Rhodococcus) group, the Arthrobacter (Arthrobacter) group, The approach using a micro bacterium (Microbacterium) group (JP,61-162193,A), The approach using a fusarium (Fusarium) group (JP,64-86889,A), The approach using the Acinetobacter (Acinetobacter) group (JP,2-154692,A), The approach using the Xanthobacter (Xanthobacter) group (JP,4-197189,A), The approach using a klebsiella (Klebsiella) group (Arch.Microbiology, Vol.156, and p.231-238 (1991)), A streptomyces (Streptomyces) group, a Serratia (Serratia) group, An ERUBINIA (Erwinia) group, a TSUKAMURERA (Tukamurell) group, A GORUDONA (Gordona) group, the Morganella (Morganella) group, The Proteus (Proteus) group, an ENATEROBAKUTA (Enterobacter) group, A micro ASUKASU (Microasucus) group, the Candida (Candida) group, The approach using a punt air (Pantoea) group (JP,5-15384,A), The approach using the Citrobacter (Citrobacter) group (JP,5-30984,A), The approach using the Aeromonas (Aeromonas) group (5-30983), The approach (JP,5-236977,A) using a rhizobium (Rhizobium) group and the approach (JP,6-14786,A) using the Agrobacterium (Agrobacterum) group are learned. Moreover, the method (JP,4-360689,A) of using the Arthrobacter (Arthrobacter) group, the Caseobacter (Caseobacter) group, a Nocardia (Nocardia) group, the Pseudonocardia (Pseudonocardia) group, and a Rhodococcus (Rhodococcus) group as the manufacture approach of 4-halo 3-hydroxybutyric acid from 4-halo 3-hydroxy butyronitrile is learned as one example of an approach which manufactures the organic acid which hydrates a nitril compound and corresponds.

[0003] All of the microorganism which has the capacity to change into a corresponding organic acid the microorganism or nitril compound which has the capacity to change the above-mentioned nitril compound into a corresponding amide compound are the microorganisms to which the growth temperature requirement is called the so-called mesophile which is 10 degrees C - 50 degrees C. Since the nitril hydration enzyme which these microorganisms have has low thermal stability, it faces manufacturing an amide compound from a nitril compound by these microorganisms, and 0-30 degrees C of reactions are usually preferably performed at 0-15 degrees C (JP,56-38118,B). Moreover, since the nitril hydration enzyme which these microorganisms have has stable pH range and optimal pH in the range of pH 7-9 in many cases, pH of the reaction using these microorganisms is performed in general on condition that pH of pH 7-9 and alkalescence [neutrality / comparatively narrow].

[0004] Thus, although some kinds of enzymes which the microorganism and this microorganism which have the capacity to transform the microorganism or the nitril compound which has the capacity to transform a nitril compound to a corresponding amide compound to a corresponding organic acid produce are known, generally, pH stability and the optimal-pH range are restricted to narrow pH range, and fields, such as stability over the amide compound which is a product further, are not necessarily enough [the enzyme of these microorganisms / it is low, and] as thermal stability. Therefore, the manufacturing method of the still more efficient amide compound using the microorganism which conquered the above-mentioned trouble is searched for. However, the microorganism which conquered the above-mentioned trouble is not known until now.

[0005] On the other hand, the thermophilic bacterium grown under an elevated temperature 55 degrees C or more is known by the nature. It is known that the enzyme which a thermophilic bacterium produces often shows high thermal resistance and large pH stability. However, the enzyme in which high activity is shown over large pH range is not known until now. Moreover, it is known that the enzyme which a thermophilic bacterium produces is often stable to protein modifiers, such as 7M urea, 6M guanidine hydrochloride, or 1%SDS. However, about the stability over the reactant high amide compound which has double association like acrylamide or methacrylamide, it was not known at all until now.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The purpose of this invention is to offer the manufacturing method of the efficient amide compound using the microorganism which has large pH stability and optimal pH range, high thermal

resistance, and amide resistance, and has the capacity to change a nitril compound into the amide which hydrates and corresponds.

[0007]

[Means for Solving the Problem] The nitril hydration enzyme with which a thermophilic bacterium produces this invention persons had high thermal resistance, and it was predicted in the large pH range that it was probably stable. Based on this prediction, the thermophilic microorganism which has nitril hydration activity was screened.

Consequently, growth upper limit temperature found out the microorganism which has the capacity to change a nitril compound into the amide compound which hydrates and corresponds out of the microorganism belonging to the thermophilic bacterium which is 55 degrees C or more. And the enzyme which this microorganism has was stable in high thermal stability and the large pH range. The enzyme which this microorganism has in a still more surprising thing has high amide conversion ability in the large pH range, and found out that the stability over the acrylamide and meta-acrylamide which are a product was very high. When this invention persons made the culture medium, fungus body, or fungus body processing object of the above-mentioned microorganism act on this nitril compound in an aqueous medium, they found out that an amide compound generated efficiently. This invention is made based on the above-mentioned knowledge.

[0008] That is, this invention is a thermophilic bacterium whose growth upper limit temperature is 55 degrees C or more, and the manufacturing method of the amide compound by the microorganism characterize by make the processing object of the enzyme prepared from the culture medium, the fungus body, fungus body processing object, or fungus body of the microorganism which has the capacity to change a nitril compound into the amide compound which hydrates and corresponds, or this enzyme act on this nitril compound in an aqueous medium is offer.

[0009] Hereafter, this invention is explained to a detail. The microorganism used in this invention is a microorganism belonging to the thermophilic bacterium whose growth upper limit temperature is 55 degrees C or more, if it has the capacity to change a nitril compound into the amide compound which hydrates and corresponds, there will be especially no limit, and what was separated from the nature could be invented by means, such as mutation and genetic manipulation. As an example of these microorganisms, the thing belonging to the Pseudonocardia (Pseudonocardia) group can use it suitably, and it is specifically the Pseudonocardia thermostat filler (Pseudonocardia thermophila) ATCC19285. It is mentioned. This strain is American. It can obtain easily from a type culture collection (American Typeculture Collection:ATCC). The capacity to change the nitril compound which the microorganism used in this invention has into the amide compound which hydrates and corresponds points out the activity which changes a nitril compound into the amide compound which hydrates and corresponds, and nitril hydratase is known as an enzyme which has such activity.

[0010] As long as the culture medium which cultivates the microorganism used in this invention attains the purpose, in any way, there is no special limit, and if they are the carbon source which use strain can use, a nitrogen source, mineral, and a thing that contains the heterotrophism object of a minute amount etc. suitably further, both a synthetic medium and a natural medium can use it. Moreover, the amide compound generative capacity from a nitril compound may be able to obtain a high microorganism fungus body by adding amide compounds, such as nitril or croton amides, such as isobutyronitrile, and methacrylamide, to a little culture medium in culture. although a culture condition changes also with strain or culture media — culture temperature — 20-70 degrees C — desirable — 40-60 degrees C — more — desirable — 50-60 degrees C — it is — pH of a culture medium — 4-9 — it is 6-8 preferably. the microorganism about this invention — the above-mentioned conditions — a liquid — or solid culture is carried out. Liquid culture is suitable in order to obtain a fungus body in large quantities. In this invention, the fungus body or fungus body processing object in which the harvest was carried out by the culture medium obtained by doing in this way, centrifugal separation, filtration, etc. is used as a source of an enzyme. As a fungus body processing object, the fixed object of mechanical destruction, sonication, freeze-thawing processing, desiccation processing, solvent processing, pressurization reduced pressure processing, osmotic pressure treatment, autolysis, surfactant processing, the thing that carried out oxygenation, a fungus body, and a fungus body extract etc. is mentioned in a fungus body. Moreover, the enzyme extracted from the fungus body and its fixed object are also the criteria of a fungus body processing object, and are used as a source of an enzyme.

[0011] As a nitril compound with which a hydration reaction is presented in this invention, the nitril of the large range, for example, aliphatic series nitril, aromatic series nitril, heterocycle type nitril, and cyanohydrins are contained. as aliphatic series nitril — the saturation of carbon numbers 2-6, or unsaturated nitrile — for example An acetonitrile, propionitrile, butyronitrile, isobutyronitrile, Saturation mono-nitril, such as barrel nitril, iso valerionitrile, and capronitrile; MARONO nitril, Saturation dinitrile; alpha-amino propionitriles, such as SAKUSHINO nitril and an adiponitrile, alpha or beta amino nitril, such as alpha-amino butyronitrile, alpha-amino acetonitrile, and beta-amino propionitrile, Unsaturated nitrile, such as hydroxy nitril, such as lactonitrile and a hydroxy acetonitrile, acrylic nitril, meta-acrylonitrile, and crotononitrile, etc. is mentioned. As aromatic series nitril, cyano pyridines, cyano pyrazines, and cyano indoles are mentioned as a benzonitrile, o-, m- and p-chlorobenzo nitril, o-, m- and p-fluorobenzo nitril, o-, m- and p-nitrobenzo nitril, o-, m- and p-amino benzonitrile, o-, m- and p-torr nitril, benzyl cyanide, and heterocycle type nitril. Acetone cyanhydrin, mandelonitrile, etc. are mentioned as a cyanohydrin.

[0012] The reaction which changes a nitril compound into the amide compound which hydrates and corresponds is performed by contacting the above-mentioned source of an enzyme, and a nitril compound to the bottom of standing or loose stirring in an aqueous medium. Although the source of an enzyme and a nitril compound are contained and also there is no limit into an aqueous medium, the matter which has buffer capacity may be added suitably as occasion demands. Although there is especially no limit in the concentration of the nitril compound

which is a substrate, it is usually about 0.1 – 30 % of the weight. Moreover, a nitril compound may be added to reaction mixture continuously or intermittently. The addition to the reaction mixture of the processing object of the nitril hydration enzyme prepared from the culture medium, the fungus body, fungus body processing object, or fungus body which is a source of an enzyme, or this enzyme should just add it in the 0.1–10g [/l.] range by dry-cell-weight conversion, although there is especially no limit. a reaction — usually — 0–80 degrees C — desirable — 0–70 degrees C — more — desirable — 10–60 degrees C and pH 3–10 — desirable — 4–10 — it is more preferably carried out in 5–10. Although reaction time changes with reaction conditions which are an enzyme potency and a substrate, such as a class of nitril compound, and concentration, it is usually about 1 – 50 hours. Thus, if it reacts, in reaction mixture, the amide compound corresponding to the nitril compound of a substrate will generate. Well-known approaches, such as concentration crystallization, are used as an approach of extracting an amide compound from reaction mixture.

[0013]

[Example] Hereafter, although the example explained this invention concretely, liquid chromatography equipped with the strong acid nature cation-exchange-resin packed column and UV extinction detector performed the quantum of an amide compound.

[0014] 0.4% of fusibility starch, and phosphoric-acid 1 potassium 0.03%, phosphoric-acid disodium 0.06%, the Pseudonocardia thermostat filler (Pseudonocardia thermophila) ATCC19285 was inoculated into 100ml of liquid media of pH7.0 containing 0.01% of magnesium sulfate 7 hydrates, NaCl 0.5%, 0.05% of sodium formates, cobalt chloride 6 hydrate 10 mg/l, and methacrylamide 0.2%, and shaking culture was carried out at 50 degrees C example 1 yeast extractives 0.5% for 48 hours. From culture medium, centrifugal separation of the fungus body was carried out, and it was washed. The reaction performed acrylonitrile 200mM and 10 degrees C of fungus bodies in the water solution (NaOH adjusts pH to 6.0) which contains 1 g/l by dry weight conversion, stirring gently for 1 hour. When a part of reaction mixture was diluted after reaction termination and liquid chromatography analyzed, all the added acrylic nitril was changed into acrylamide (100% of conversion rates).

[0015] Only the example 2 reaction substrate was changed into each nitril compound shown in the 1st table (Table 1), and reacted by the same approach as an example 1 (the addition of a nitril compound is 200mM(s), respectively). Consequently, in each reaction mixture, the amide compound corresponding to the nitril compound of a substrate was generating by the concentration shown in the 1st table (Table 1).

[0016]

[Table 1]

The 1st table	The nitril compound of a substrate	A generation amide compound	The amount of amidation (mM)
PUROPIO amide 158	beta-hydroxy propionitrile	beta-hydroxy PUROPIO amide 123	methacrylonitriles
Methacrylamide 78	butyronitrile	A butyl amide 45	isobutyronitrile
An isobutyl amide 48	SAKUSHINO nitril	The Succin amide 28	valeronitrile
Valeric amide 35	adiponitriles	An AJIPO amide 21	NIKOSCHINO nitril
Nicotinamide	Four benzonitriles	Benzamide 2	cyano pyrazine
Pyrazine carboxamide	5DL MANDERO nitril	MANDERU amide 7	

[0017] The Pseudonocardia thermostat filler (Pseudonocardia thermophila) ATCC19285 was cultivated by the same approach as example 3 example 1. From culture medium, centrifugal separation of the fungus body was carried out, and it was washed. While a reaction uses a pump and adds acrylic nitril continuously in the amount of 2.4g per hour in 30ml (pH6.0) of 25mM phosphate buffers which contain 10 g/l for a fungus body by dry weight conversion It carried out by stirring gently at 10 degrees C. When a part of reaction mixture was diluted 5 hours after and liquid chromatography analyzed, the acrylamide of 400 g/l was being accumulated (98% of nitril yield for an acrylic).

[0018] The Pseudonocardia thermostat filler (Pseudonocardia thermophila) ATCC19285 was cultivated by the same approach as example 4 example 1. From culture medium, centrifugal separation of the fungus body was carried out, and it was washed. 10ml [of 50mM potassium phosphate buffer solutions] (pH6.8) and acrylamide 8.4g, 0.8g [of the 4th class ghosts of a dimethylamino methyl methacrylate methyl chloride], and methylenebis acrylamide 0.8g was suspended in 10g of wet fungus bodies at homogeneity. Dimethylamino propionitrile 1ml and 1ml of 5% potassium persulfate were mixed to homogeneity 10% at this, and polymerization gelation was carried out in iced water. This fungus body content gel was crushed to the wafer with the blender, this was washed, and it considered as the immobilized cell. The reaction added 0.5g for the immobilized cell by dry weight conversion into 30ml (pH6.0) of 25mM phosphate buffer solutions, adding 2.4g per hour of acrylonitrile continuously using a pump, at 10 degrees C, was stirred gently and performed. The acrylamide of 400 g/l was being accumulated 5 hours after and into reaction mixture (98% of molar yields).

[0019] The Pseudonocardia thermostat filler (Pseudonocardia thermophila) ATCC19285 was cultivated by the same approach as example 5 example 1. From culture medium, centrifugal separation of the fungus body was carried out, and it was washed. The reaction performed acrylic nitril 200mM and a fungus body by dry weight conversion, being each reaction temperature in the included water solution (NaOH adjusting pH to pH6.0), and stirring 1 g/l gently for 1 hour. When a part of reaction mixture was diluted after reaction termination and liquid chromatography analyzed, in each reaction mixture, acrylamide was generating by the concentration shown in the 2nd table (Table 2). This showed that the approach of this invention could react at higher temperature compared with the conventional approach.

[0020]

[Table 2]

第2表

反応温度	アミド (mM)
0℃	180
10℃	200
20℃	200
30℃	200
40℃	200
50℃	200
60℃	200
70℃	112
80℃	28

[0021] The *Pseudonocardia* thermostat filler (*Psuedonocar-dia thermophila*) ATCC19285 was cultivated by the same approach as example 6 example 1. From culture medium, centrifugal separation of the fungus body was carried out, and it was washed. The reaction performed acrylic nitril 200mM and 10 degrees C of fungus bodies in the water solution (NaOH or H2SO4 adjusts pH to each pH) which contains 1 g/l by dry weight conversion, stirring gently for 1 hour. When a part of reaction mixture was diluted after reaction termination and liquid chromatography analyzed, in each reaction mixture, acrylamide was generating by the concentration shown in the 3rd table (Table 3). This showed that the approach of this invention had high reactivity in the large pH range compared with the conventional approach.

[0022]

[Table 3]

第3表

反応pH	アミド (mM)
3	36
4	180
5	200
6	200
7	200
8	200
9	200
10	200

[0023] The *Pseudonocardia* thermostat filler (*Psuedonocar-dia thermophila*) ATCC19285 was cultivated by the same approach as example 7 example 1. From culture medium, centrifugal separation of the fungus body was carried out, and it was washed. It was made dry weight, about 5mg was suspended in 1ml (pH7.0) of 50mM phosphate buffer solutions, and it heat-treated at 40 degrees C for 2 hours. On the other hand, it was made dry weight, and after suspending about 5mg in 1ml (pH7.0) of 50mM phosphate buffer solutions which added 30% of acrylamide and placing it at 10 degrees C for 2 hours, 50mM phosphate buffer solution (pH7.0) fully washed, and it suspended again by 1ml (pH7.0) of 50mM phosphate buffer solutions. 0.2ml of each fungus body suspension was taken, in addition to 0.8ml (pH6.0) of 50mM phosphate buffer solutions, the acrylic nitril of 200mM was added, and 10 degrees C reacted, stirring gently for 1 hour. A part of reaction mixture was diluted after reaction termination, and liquid chromatography analyzed. The acrylamide accumulated dose of each processing division was shown in the 4th table (Table 4) by the relative value when making the acrylamide accumulated dose of an unsettled division (control) into 100%.

[0024] Only culture temperature was changed into 28 degrees C by the same approach as example of comparison 1 example 1, and the *Pseudonocardia* compactor (*Psuedonocardia compacta*) IFO14325 and the *Pseudonocardia* compactor (*Psuedonocardia compacta*) IFO14343 were cultivated. In addition, each of such strain comes to hand easily from Institute for Fermentation, Osaka (2-17-85, Jusohommachi, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka). From

culture medium, centrifugal separation of the fungus body was carried out, and it was washed. It was made dry weight, about 5mg was suspended in 1ml (pH7.0) of 50mM phosphate buffer solutions, and it heat-treated at 40 degrees C for 2 hours. On the other hand, it was made dry weight, and after suspending about 5mg in 1ml (pH7.0) of 50mM phosphate buffer solutions which added 30% of acrylamide and placing it at 10 degrees C for 2 hours, 50mM phosphate buffer solution (pH7.0) fully washed, and it suspended again by 1ml (pH7.0) of 50mM phosphate buffer solutions. 0.2ml of each fungus body suspension was taken, in addition to 0.8ml (pH6.0) of 50mM phosphate buffer solutions, the acrylic nitril of 200mM was added, and 10 degrees C reacted, stirring gently for 1 hour. A part of reaction mixture was diluted after reaction termination, and liquid chromatography analyzed. The acrylamide accumulated dose of each processing division was shown in the 4th table (Table 4) by the relative value when making the acrylamide accumulated dose of an unsettled division (control) into 100%. Even if it is the microorganism which belongs to the same Psuedonocardia group from this, as compared with thermophilic-bacteria nature, it turns out that thermal resistance and the resistance over acrylamide are inferior in mesophile.

[0025]

[Table 4]

The 4th table ----- Thermal resistance AAm resistance Growth temperature
Control 40 degrees C, 2hr 30%, 10-degreeC, 2hr ----- Example 7
P.thermophila ATCC 19285 50 degrees C 100%100% 100% The example 1 of a comparison P. compacta IFO14325 28
degrees C 100% 28% 1% P.compacta IFO14343 28 degrees C 100% 34% 6% -----

- Relative value when making the acrylamide accumulated dose of control into 100% AAm: Acrylamide [0026]

[Effect of the Invention] According to the approach of this invention, a larger temperature requirement and the reaction which generates an amide compound from a nitril compound especially at the high temperature of 40 degrees C or more are possible, and manufacture of a more efficient amide compound is attained compared with a Prior art. Moreover, according to the approach of this invention, since the stable reaction is possible in the large pH range, it faces changing a nitril compound into the amide compound which hydrates and corresponds, and it is not necessary to adjust pH strictly. Moreover, according to the approach of this invention, it becomes possible to manufacture an amide compound with high purity moreover by high concentration.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-56684

(43) 公開日 平成8年(1996)3月5日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 13/02		2121-4B		
// (C 1 2 P 13/02				
C 1 2 R 1:01)				

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平6-192572	(71) 出願人	000003126 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号
(22) 出願日	平成6年(1994)8月16日	(72) 発明者	及川 利洋 福岡県大牟田市平原町300 平原アパート 412号
		(72) 発明者	八巻 俊文 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学 株式会社内
		(72) 発明者	有井 輝夫 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学 株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物によるアミド化合物の製造法

(57) 【要約】

【目的】 広いpH安定性・至適pH範囲、高い耐熱性及びアミド耐性を有し、ニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物に変換する能力を有する微生物を用いた、効率のよいアミド化合物の製造法を提供する。

【構成】 生育上限温度が55℃以上であるところの好熱性菌であり、ニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物に変換する能力を有する微生物の培養液、菌体もしくは菌体処理物を水性媒体中にて該ニトリル化合物に作用させる。

【効果】 本発明の方法によれば、厳密にpHを調整する必要がないため簡便であり、高温での反応が可能となることから効率のよいアミド化合物の製造が可能となる。また高濃度でしかも純度の高いアミド化合物を製造することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生育上限温度が55℃以上であるところの好熱性菌であり、ニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物に変換する能力を有する微生物の培養液、菌体もしくは菌体処理物を水性媒体中にて該ニトリル化合物に作用させることを特徴とする微生物によるアミド化合物の製造法。

【請求項2】 生育上限温度が55℃以上であるところの好熱性菌でありシュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属に属し、ニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物に変換する能力を有する微生物の培養液、菌体もしくは菌体処理物を水性媒体中にて該ニトリル化合物に作用させることを特徴とする微生物によるアミド化合物の製造法。

【請求項3】 シュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属に属する微生物がシュードノカルディア・サーモフィラ (*Pseudonocardia thermophila*) ATCC19285であることを特徴とする請求項2記載のアミド化合物の製造法。

【請求項4】 ニトリル化合物が、アクリルニトリル、メタアクリロニトリルであることを特徴とする請求項2または3記載のアミド化合物の製造法。

【請求項5】 反応温度が0～80℃であることを特徴とする請求項1～4記載のアミド化合物の製造法。

【請求項6】 反応のpHが3～10であることを特徴とする請求項1～5記載のアミド化合物の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、微生物の作用によりニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、微生物を用い、ニトリル化合物からアミド化合物を生産する方法がいくつか提案されている。例えば、バチルス (*Bacillus*) 属、バクテリジウム (*Bacteridium*) 属、マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属を用いる方法 (特公昭62-21519)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ノカルジア (*Nocardia*) 属を用いる方法 (特公昭56-17918号公報)、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属を用いる方法 (特公昭59-37951号公報)、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、マイクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属を用いる方法 (特開昭61-162193号公報)、フサリウム (*Fusarium*) 属を用いる方法 (特開昭64-86889号公報)、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属を用いる方法 (特開平2-154692号公報)、キサントバクター (*Xanthobacter*) 属を用いる方法 (特開平4-197189号公報)、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属を用いる方法

(Arch. Microbiology, Vol.156, p.231-238, (1991))、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、ツカムレラ (*Tukamurella*) 属、ゴルドナ (*Gordonia*) 属、モルガネラ (*Morganella*) 属、プロテウス (*Proteus*) 属、エナテロバクター (*Enterobacter*) 属、マイクロアスカス (*Microascus*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、パントエア (*Pantoea*) 属を用いる方法 (特開平5-15384号公報)、シトロバクター (*Citrobacter*) 属を用いる方法 (特開平5-30984号公報)、エアロモナス (*Aeromonas*) 属を用いる方法 (5-30983)、リゾビウム (*Rhizobium*) 属を用いる方法 (特開平5-23697号公報)、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属を用いる方法 (特開平6-14786号公報) が知られている。また、ニトリル化合物を水和して対応する有機酸を製造する方法の1例として、4-ハロー3-ヒドロキシブチロニトリルから4-ハロー3-ヒドロキシ酪酸の製造方法としてアルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、カセオバクター (*Caseobacter*) 属、ノカルディア (*Nocardia*) 属、シュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属およびロドコッカス (*Rhodococcus*) 属を用いる方法 (特開平4-360689号公報) が知られている。

【0003】 上記のニトリル化合物を対応するアミド化合物に変換する能力を有する微生物あるいはニトリル化合物を対応する有機酸に変換する能力を有する微生物は、いずれもその生育温度範囲が10℃～50℃であるいわゆる常温菌と呼ばれる微生物である。これら微生物の有するニトリル水和酵素は熱安定性が低いため、これら微生物によりニトリル化合物からアミド化合物を製造するに際しては、通常0～30℃、好ましくは0～15℃で反応が行われる (特公昭56-38118号公報)。また、これら微生物の有するニトリル水和酵素は多くの場合安定なpH範囲・至適pHがpH7～9の範囲にあることから、これら微生物を用いた反応のpHは概ねpH7～9と比較的狭い中性から弱アルカリ性のpHの条件で行われる。

【0004】 このように、ニトリル化合物を対応するアミド化合物に変換させる能力を有する微生物またはニトリル化合物を対応する有機酸に変換させる能力を有する微生物及び該微生物が生産する酵素が幾種類か知られているが、それら微生物の酵素は一般に熱安定性が低く、pH安定性・至適pH範囲が狭いpH範囲に限られ、更に生成物であるアミド化合物に対する安定性などの面で必ずしも十分ではない。そのため、上記問題点を克服した微生物を用いた、さらに効率の良いアミド化合物の製造法が求められている。しかし、上記問題点を克服した微生物はこれまで知られていない。

【0005】 一方、自然界には55℃以上の高温下で生育する好熱性菌が知られている。好熱性菌の生産する酵素はしばしば高い耐熱性と広いpH安定性を示すことが

知られている。しかし、広いpH範囲にわたって高い活性を示す酵素はこれまで知られていない。また、好熱性菌の生産する酵素は、しばしば7M尿素、6M塩酸グアニジンあるいは1%SDS等のタンパク変性剤に対して安定であることが知られている。しかし、アクリルアミドやメタクリルアミドの様に2重結合を持つ反応性の高いアミド化合物に対する安定性についてはこれまで全く知られていなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、広いpH安定性・至適pH範囲、高い耐熱性及びアミド耐性を有し、ニトリル化合物を水和して対応するアミドに変換する能力を有する微生物を用いた、効率のよいアミド化合物の製造法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、好熱性菌の生産するニトリル水和酵素は高い耐熱性を持ち、広いpH範囲で安定であろうと予測した。該予測に基づき、ニトリル水和活性を有する好熱性微生物のスクリーニングを行った。その結果、生育上限温度が55℃以上である好熱性菌に属する微生物の中からニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物へ変換する能力を有する微生物を見出した。しかも、該微生物の有する酵素は高い熱安定性と広いpH範囲で安定であった。さらに驚くべきことに該微生物の有する酵素は、広いpH範囲で高いアミド変換能を有し、生成物であるアクリルアミドやメタアクリルアミドに対する安定性が極めて高いことを見出した。本発明者らは、上記微生物の培養液、菌体もしくは菌体処理物を水性媒体中にて該ニトリル化合物に作用させたところ、効率よくアミド化合物が生成することを見いだした。本発明は、上記知見に基づきなされたものである。

【0008】すなわち、本発明は生育上限温度が55℃以上であるところの好熱性菌であり、ニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物に変換する能力を有する微生物の培養液、菌体もしくは菌体処理物もしくは菌体より調製した酵素または該酵素の処理物を水性媒体中にて該ニトリル化合物に作用させることを特徴とする微生物によるアミド化合物の製造法を提供するものである。

【0009】以下、本発明について詳細に説明する。本発明において使用される微生物は、生育上限温度が55℃以上である好熱性菌に属する微生物であり、ニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物に変換する能力を有するものであれば特に制限はなく、自然界から分離されたものでも、突然変異、遺伝子操作等の手段により創製されたものでも良い。これらの微生物の例としては、シュードノカルディア (*Psuedonocardia*) 属に属するものが好適に使用でき、具体的にはシュードノカルディア・サーモフィラ (*Psuedonocardia thermophila*) ATCC19285 が挙げられる。この菌株は、アメリカン タイ

プカルチャーコレクション (American Typeculture Collection: ATCC) から容易に入手することができる。本発明において使用される微生物の有するニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物に変換する能力とは、ニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物に変換する活性を指し、その様な活性を有する酵素としてはニトリルヒドラーゼが知られている。

【0010】本発明において用いられる微生物を培養する培地は、目的を達する限り何ら特別の制限はなく、使用菌株の利用し得る炭素源、窒素源、無機塩類、更に微量の有機栄養物などを適当に含有するものであれば合成培地、天然培地のいずれも使用できる。また、培養にあたってはイソブチロニトリルなどのニトリル類または、クロトンアミドやメタクリルアミドなどのアミド化合物を少量培地に添加することにより、ニトリル化合物からのアミド化合物生成能力が高い微生物菌体を得ることができることもある。培養条件は菌株や培地によっても異なるが、培養温度は20～70℃、好ましくは40～60℃、より好ましくは50～60℃であり、培地のpHは、4～9、好ましくは6～8である。本発明に関する微生物は、上記条件で液体、或いは固体培養される。菌体を大量に得るためには、液体培養が適している。本発明においては、このようにして得られた培養液、遠心分離、濾過等により集菌された菌体または菌体処理物を酵素源として用いる。菌体処理物としては、菌体を機械的破壊、超音波処理、凍結融解処理、乾燥処理、溶媒処理、加圧減圧処理、浸透圧処理、自己消化、界面活性剤処理、酸素処理したもの、菌体および菌体抽出物の固定化物などが挙げられる。また、菌体より抽出された酵素及びその固定化物も菌体処理物の範疇であり、酵素源として用いられる。

【0011】本発明において水和反応に供されるニトリル化合物としては、広い範囲のニトリル、たとえば脂肪族ニトリル、芳香族ニトリル、複素環式ニトリル、シアノヒドリン類などが含まれる。脂肪族ニトリルとしては、炭素数2～6の飽和または不飽和ニトリル、たとえば、アセトニトリル、プロピオニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリル、パレルニトリル、イソパレロニトリル、カプロニトリルなどの飽和モノニトリル類；マロノニトリル、サクシノニトリル、アジポニトリルなどの飽和ジニトリル類； α -アミノプロピオニトリル、 α -アミノブチロニトリル、 α -アミノアセトニトリル、 β -アミノプロピオニトリルなどの α または β アミノニトリル類、ラクトニトリル、ヒドロキシアセトニトリル、などのヒドロキシニトリル類、アクリルニトリル、メタアクリロニトリル、クロトニトリルなどの不飽和ニトリルなどが挙げられる。芳香族ニトリルとしては、ベンゾニトリル、*o*-, *m*-, および*p*-クロロベンゾニトリル、*o*-, *m*-, および*p*-フルオロベンゾニトリル、*o*-, *m*-, および*p*-ニトロベンゾニトリル

ル、o-、m-、およびp-アミノベンズニトリル、o-、m-、およびp-トルニトリル、ベンジルシアナイド、複素環式ニトリルとしては、シアノピラジン類、シアノピラジン類、シアノインドール類などが挙げられる。シアノヒドリンとしては、アセトンシアノヒドリン、マンデルニトリルなどが挙げられる。

【0012】ニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物に変換する反応は、上記酵素源とニトリル化合物を水性媒体中にて静置またはゆるやかな攪拌下に接触させることにより行われる。水性媒体中には、酵素源とニトリル化合物を含有する他特に制限はないが、必要により、緩衝能を有する物質を適宜添加してもよい。基質であるニトリル化合物の濃度には特に制限はないが、通常は0.1~30重量%程度である。また、ニトリル化合物は連続的または間欠的に反応液に添加しても良い。酵素源である培養液、菌体もしくは菌体処理物もしくは菌体より調製したニトリル水和酵素または該酵素の処理物の反応液への添加量は、特に制限はないが、乾燥菌体重量換算で0.1~10g/lの範囲で添加すればよい。反応は通常0~80℃、好ましくは0~70℃、より好ましくは10~60℃、pH3~10、好ましくは4~10、より好ましくは5~10の範囲で行われる。反応時間は、酵素力価や基質であるニトリル化合物の種類や濃度等の反応条件により異なるが、通常は1~50時間程度である。このようにして反応を行うと反応液中には、基質のニトリル化合物に対応するアミド化合物が生成する。反応液からアミド化合物を採取する方法としては、濃縮品析等公知の方法が用いられる。

【0013】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明す

第1表

基質のニトリル化合物	生成アミド化合物	アミド生成量(mM)
アセトニトリル	アセトアミド	200
プロピオニトリル	プロピオアミド	158
β -ヒドロキシプロピオニトリル	β -ヒドロキシプロピオアミド	123
メタクリロニトリル	メタクリルアミド	78
ブチロニトリル	ブチルアミド	45
イソブチロニトリル	イソブチルアミド	48
サクシノニトリル	サクシンアミド	28
バレロニトリル	バレルアミド	35
アジポニトリル	アジポアミド	21
ニコチノニトリル	ニコチンアミド	4
ベンズニトリル	ベンズアミド	2
シアノピラジン	ピラジンカルボキサミド	5
DL マンデロニトリル	マンデルアミド	7

【0017】実施例3

実施例1と同様の方法でシュードノカルディア・サーモ

フィラ (Psuedonocardia thermophila) ATCC19285を培養した。培養液より菌体を遠心分離し、洗浄した。反応

【0014】実施例1

イーストエキス0.5%、可溶性でんぷん0.4%、リン酸1カリウム0.03%、リン酸2ナトリウム0.06%、硫酸マグネシウム7水和物0.01%、NaCl0.5%、ギ酸ナトリウム0.05%、塩化コバルト6水和物10mg/l、およびメタクリルアミド0.2%を含むpH7.0の液体培地100mlにシュードノカルディア・サーモフィラ (Psuedonocardia thermophila) ATCC19285を接種し、50℃で48時間振盪培養した。培養液より菌体を遠心分離し洗浄した。反応はアクリロニトリル200mM、菌体を乾燥重量換算で1g/lを含む水溶液(pHはNaOHにより6.0に調整)中で、10℃、1時間ゆるやかに攪拌しながら行った。反応終了後、反応液の一部を希釈して、液体クロマトグラフィーにより分析したところ、添加したアクリロニトリルは全てアクリルアミドに変換されていた(変換率100%)。

【0015】実施例2

反応基質のみ、第1表(表1)に示した各ニトリル化合物に変更し、実施例1と同様の方法で反応を行った(ニトリル化合物の添加量はそれぞれ200mM)。その結果、それぞれの反応液中には第1表(表1)に示した濃度で基質のニトリル化合物に対応するアミド化合物が生成していた。

【0016】

【表1】

フィラ (Psuedonocardia thermophila) ATCC19285を培養した。培養液より菌体を遠心分離し、洗浄した。反応

は、菌体を乾燥重量換算で10 g/lを含む25 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) 30 ml中に、ポンプを用いてアクリルニトリルを1時間あたり2.4 gの量で連続的に添加しながら10℃でゆるやかに攪拌して行った。5時間後、反応液の一部を希釈して、液体クロマトグラフィーにより分析したところ、400 g/lのアクリルアミドが蓄積していた (対アクリルニトリル収率98%)。

【0018】実施例4

実施例1と同様の方法でシュードノカルディア・サーモフィラ (*Psuedonocardia thermophila*) ATCC19285を培養した。培養液より菌体を遠心分離し、洗浄した。湿菌体10 gに50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) 10 ml、アクリルアミド8.4 g、ジメチルアミノメチルメタクリレート塩化メチル4級化物0.8 g、メチレンビスアクリルアミド0.8 gを均一に懸濁した。これに10%ジメチルアミノプロピオニトリル1 ml、5%過硫酸カリウム1 mlを均一に混合し氷水中で重合ゲル化させた。この菌体含有ゲルをブレンダーにて小片に破碎し、これを洗浄し固定化菌体とした。反応は、25 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) 30 ml中に固定化菌体を乾燥重量換算で0.5 gを加え、ポンプを用いてアクリロニトリルを1時間あたり2.4 g連続的に添加しながら10℃でゆるやかに攪拌して行った。5時間後、反応液中には400 g/lのアクリルアミドが蓄積していた (モル収率98%)。

【0019】実施例5

実施例1と同様の方法でシュードノカルディア・サーモフィラ (*Psuedonocardia thermophila*) ATCC19285を培養した。培養液より菌体を遠心分離し、洗浄した。反応はアクリルニトリル200 mM、菌体を乾燥重量換算で1 g/lを含む水溶液 (pHはNaOHによりpH 6.0に調整) 中で、各反応温度で、1時間ゆるやかに攪拌しながら行った。反応終了後、反応液の一部を希釈して、液体クロマトグラフィーにより分析したところ、それぞれの反応液中には第2表 (表2) に示した濃度でアクリルアミドが生成していた。このことから、本発明の方法は従来の方法に比べ、より高い温度で反応することができたことがわかった。

【0020】

【表2】

第2表

反応温度	アミド (mM)
0℃	180
10℃	200
20℃	200
30℃	200
40℃	200
50℃	200
60℃	200
70℃	112
80℃	28

【0021】実施例6

実施例1と同様の方法でシュードノカルディア・サーモフィラ (*Psuedonocardia thermophila*) ATCC19285を培養した。培養液より菌体を遠心分離し、洗浄した。反応はアクリルニトリル200 mM、菌体を乾燥重量換算で1 g/lを含む水溶液 (pHはNaOHまたはH₂SO₄により各pHに調整) 中で、10℃、1時間ゆるやかに攪拌しながら行った。反応終了後、反応液の一部を希釈して、液体クロマトグラフィーにより分析したところ、それぞれの反応液中には第3表 (表3) に示した濃度でアクリルアミドが生成していた。このことから、本発明の方法は、従来の方法に比べ広いpH範囲で高い反応性を有することがわかった。

【0022】

【表3】

第3表

反応pH	アミド (mM)
3	36
4	180
5	200
6	200
7	200
8	200
9	200
10	200

【0023】実施例7

実施例1と同様の方法でシュードノカルディア・サーモフィラ (*Psuedonocardia thermophila*) ATCC19285を培養した。培養液より菌体を遠心分離し、洗浄した。乾燥重量にして約5 mgを50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 mlに懸濁し、40℃で2時間熱処理した。一方、乾燥重量にして約5 mgを30%のアクリルアミドを添加した50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml

に懸濁し、10℃で2時間置いた後、50mMリン酸緩衝液（pH7.0）で十分に洗浄し、再度50mMリン酸緩衝液（pH7.0）1mlで懸濁した。それぞれの菌体懸濁液0.2mlを取り、50mMリン酸緩衝液（pH6.0）0.8mlに加え、200mMのアクリルニトリルを添加し、10℃、1時間ゆるやかに攪拌しながら反応を行った。反応終了後、反応液の一部を希釈して、液体クロマトグラフィーにより分析した。第4表（表4）に、未処理区（コントロール）のアクリルアミド蓄積量を100%としたときの相対値でそれぞれの処理区のアクリルアミド蓄積量を示した。

【0024】比較例1

実施例1と同様の方法で培養温度だけ28℃に変更して、シュードノカルディア・コンパクト（*Psuedonocardia compacta*）IF014325及びシュードノカルディア・コンパクト（*Psuedonocardia compacta*）IF014343を培養した。尚、これらの菌株は何れも発酵研究所（大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号）から容易に入手される。培養液より菌体を遠心分離し、洗浄した。乾燥重量にして約5mgを50mMリン酸緩衝液（pH

7.0）1mlに懸濁し、40℃で2時間熱処理した。一方、乾燥重量にして約5mgを30%のアクリルアミドを添加した50mMリン酸緩衝液（pH7.0）1mlに懸濁し、10℃で2時間置いた後、50mMリン酸緩衝液（pH7.0）1mlで懸濁した。それぞれの菌体懸濁液0.2mlを取り、50mMリン酸緩衝液（pH6.0）0.8mlに加え、200mMのアクリルニトリルを添加し、10℃、1時間ゆるやかに攪拌しながら反応を行った。反応終了後、反応液の一部を希釈して、液体クロマトグラフィーにより分析した。第4表（表4）に、未処理区（コントロール）のアクリルアミド蓄積量を100%としたときの相対値でそれぞれの処理区のアクリルアミド蓄積量を示した。このことから、同じ*Psuedonocardia*属に属する微生物であっても、好熱菌性に比して常温菌は、耐熱性やアクリルアミドに対する耐性が劣ることがわかる。

【0025】

【表4】

第4表

		生育温度	Control	耐热性 40℃, 2hr	AAm耐性 30%, 10' C, 2hr
実施例 7					
<u>P. thermophila</u>	ATCC 19285	50℃	100%	100%	100%
比較例1					
<u>P. compacta</u>	IF014325	28℃	100%	28%	1%
<u>P. compacta</u>	IF014343	28℃	100%	34%	6%

コントロールのアクリルアミド蓄積量を100%としたときの相対値

AAm：アクリルアミド

【0026】

【発明の効果】本発明の方法によれば、より広い温度範囲、特に40℃以上の高い温度でニトリル化合物からアミド化合物を生成する反応が可能であり、従来の技術に比べより効率のよいアミド化合物の製造が可能となる。また、本発明の方法によれば、広いpH範囲で安定な反

応が可能なため、ニトリル化合物を水和して対応するアミド化合物に変換するに際して厳密にpHを調整する必要がない。また、本発明の方法によれば、高濃度でしかも純度の高いアミド化合物を製造することが可能となる。

フロントページの続き

(72)発明者 鶴岡 みゆき

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学
株式会社内